

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA

**ANÁLISE DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DE MICRORNAS E DE POTENCIAIS
GENES ALVO EM RESPOSTA AO ESTRESSE SALINO EM SOJA (*Glycine max*)**

Caroline Salvati

Orientador: Prof. Dr. Rogerio Margis

PORTO ALEGRE, 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA

**ANÁLISE DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DE MICRORNAS E DE POTENCIAIS
GENES ALVO EM RESPOSTA AO ESTRESSE SALINO EM SOJA (*Glycine max*)**

Caroline Salvati

Orientador: Prof. Dr. Rogerio Margis

Trabalho apresentado como um dos
requisitos para a obtenção do Grau de
Bacharel em Biotecnologia, ênfase em
Biotecnologia Molecular.

PORTO ALEGRE, 2015
CAROLINE SALVATI

**ANÁLISE DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DE MICRORNAS E DE POTENCIAIS
GENES ALVO EM RESPOSTA AO ESTRESSE SALINO EM SOJA (*Glycine max*)**

Trabalho apresentado como um dos
requisitos para a obtenção do Grau de
Bacharel em Biotecnologia, ênfase em
Biotecnologia Molecular.

Comissão examinadora:

Dra. Ana Paula Korbes
Depto. Genética, UFRGS

Prof. Dr. Raul Speroto
UNIVATES

Prof. Dr. Rogerio Margis
Departamento de Biofísica

PORTO ALEGRE, 2015

Agradecimentos

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por ter me proporcionado uma educação de excelência.

Ao professor Rogerio Margis, pela confiança e pela ótima orientação.

Aos meus colegas de laboratório, que me auxiliaram ao longo do desenvolvimento do trabalho e pela companhia.

À minha família, por estar sempre me ajudando e ser a minha base.

Ao meu namorado, pelo carinho, compreensão e auxílio ao longo dos últimos anos.

Aos meus amigos, que me acompanharam durante toda a minha trajetória.

RESUMO

Estresses por seca e salinidade são algumas das causas primárias de perdas na agricultura. O estresse salino reduz o crescimento das plantas e o rendimento de produção, devido a danos causados pelo potencial osmótico e toxicidade iônica, e atinge 6% das terras cultivadas mundialmente. A soja é uma das culturas amplamente prejudicada por este estresse, portanto o estudo dos processos regulatórios de expressão gênica em ambientes salinos é muito importante para aumentar o conhecimento e identificar possíveis alvos para o melhoramento genético. MicroRNAs são pequenos RNAs não codificadores, de aproximadamente 22 nucleotídeos, que modulam a expressão gênica por silenciamento através de inibição sequência-específica do RNA mensageiro alvo. O presente trabalho visa analisar a expressão gênica diferencial de microRNAs maduros e de seus potenciais genes alvos em resposta ao estresse salino em soja. Para tal objetivo, foram obtidas bibliotecas de RNA-seq de RNAs mensageiros e de pequenos RNAs de plântulas de soja trifolioladas incubadas com 200 mM de NaCl por 4h. Primeiramente, foi realizada uma análise do padrão de expressão dos microRNAs de soja utilizando o script isomirID e o pacote DESeq2 no ambiente R. Foram obtidos 87 microRNAs com padrão de expressão diferencial utilizando um nível de significância de 10^{-5} . As bibliotecas de sequenciamento de RNA mensageiros foram analisadas com auxílios dos softwares TopHat2 e HTSeq-count. Com o uso do pacote DESeq2 foram identificados 3726 genes diferencialmente expressos (fold change maior que 2 e nível de significância de 0,01). Foram preditos genes alvos para os 87 microRNAs diferencialmente expressos utilizando a ferramenta psRNATarget. Com este resultado, foi organizada uma tabela contendo os microRNAs e seus genes alvos preditos, ou seja, aqueles que apresentaram padrão de expressão inverso. Três microRNAs (mir172k, mir5371 e mir1512abc) e seus respectivos alvos com funções de trealose-6-fosfato sintase, endoribonuclease L-PSP e U-box E3 ligase) foram selecionados. Os dados de expressão dos genes alvos potenciais foram confirmados por RT-qPCR. Este trabalho identificou microRNAs e seus respectivos genes alvo responsivos ao estresse salino, que podem possuir papel fundamental na tolerância a este estresse.

Palavras-chave: Estresse salino; soja; microRNA, expressão gênica

ABSTRACT

Salinity and drought are primary causes of agricultural losses. Salt stress reduces plant growth and production yield due to osmotic stress and ion toxicity and affects 6% of the world's agricultural land. Soybean is widely damaged by this stress. So far, it is important to understand how gene expression is regulated in order to identify targets for plant breeding. MicroRNAs are small non-coding RNAs (~22 nt) that modulate plant gene expression through sequence-specific inhibition of target mRNAs. The aim of this study is to analyze differential gene expression of mature microRNAs and their target genes during salt stress in soybean. We performed deep sequencing of mRNAs and small RNAs of salt-stressed soybean seedlings incubated in 200mM of NaCl for 4h. First, we analyzed the expression pattern of microRNAs with isomirID and DESeq2. We identified 87 differentially expressed microRNAs with significance level 10^{-5} . Then, we analyzed the deep sequencing mRNA libraries with TopHat2, HTSeq-count and DESeq2 and we obtained 3726 differentially expressed genes with significance level 0,01. After, we predicted targets to the 87 differentially expressed microRNAs using psRNATarget and we organized a table with all microRNAs and their putative targets with reverse expression pattern. Three microRNAs(mir172k, mir5371 and mir1512abc) and their putative targets (threalose-6-phosphate synthase, endoribonuclease L-PSP and U-box E3 ligase) were selected. The expression pattern of the putative targets were analyzed by RT-qPCR and we noticed that threalose-6-phosphate synthase and U-box E3 ligase are responsive after 1h treatment with 200mM of NaCl. This work identified microRNAs and their target genes responsive to salinity, which can be important to the tolerance of salt stress.

Keywords: Salt stress; Soybean; microRNA; gene expression

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura em forma de “grampo”, característica do pré-miRNA. A região do pré-miRNA que corresponde ao microRNA maduro canônico está indicada na figura.	4
Figura 2: Visão global das principais etapas na biogênese e degradação de microRNAs em plantas. Adaptação de: (ROGERS; CHEN, 2013).....	6
Figura 3: Surgimento de manchas de clorose (setas azuis) após 24h de estresse salino.....	15
Figura 4: Categorização funcional dos genes diferencialmente expressos em folhas de soja.....	18
Figura 5: Mapa de calor relacionando os dados de expressão gênica de cada microRNA selecionado. Quanto mais vermelho, maior expressão; quanto mais azul, menor expressão.....	20
Figura 6: Dados de expressão gênica dos alvos preditos do microRNA 172k obtidos por RT-qPCR. Cnt: amostras controle; NaCl: amostras tratadas com excesso de sal.	27
Figura 7: Dados de expressão gênica dos alvos preditos (endoribonucleases L-PSP) do microRNA 1512 (a,b,c) obtidos por RT-qPCR. Cnt: amostras controle; NaCl: amostras tratadas com excesso de sal.	27
Figura 8: Dados de expressão gênica do alvo predito (U-box E3 ligase) do microRNA 5371 obtidos por RT-qPCR. Cnt: amostras controle; NaCl: amostras tratadas com excesso de sal.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências dos oligonucleotídeos dos genes alvos preditos para os microRNAs 172k, 5371 e 1512abc e genes normalizadores	14
Tabela 2: Número de reads das bibliotecas de RNA-seq de RNA mensageiros.....	16
Tabela 3: Dados do alinhamento das bibliotecas de RNA-seq no genoma da soja. .	16
Tabela 4: Número de reads e porcentagem correspondente a cada tipo de RNA descrito. mtRNA: RNA mitocondrial; cpRNA: RNA cloroplastídico; rRNA: RNA ribossomal; tRNA: RNA transportador.....	19
Tabela 5: MicroRNAs e respectivos alvos preditos com padrão de expressão inverso. FT: Fator de Transcrição.	22
Tabela 6: MicroRNAs e respectivos alvos preditos com padrão de expressão inverso. FT: Fator de Transcrição.	23
Tabela 7: Dados dos genes alvos preditos selecionados para RT-qPCR	26

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

l – litro

ml – mililitro

μ l – microlitro

μ g – micrograma

M – molar (mol/litro)

mM – milimolar (milimol/litro)

$^{\circ}$ C – graus Celsius

% - por cento

h – hora

cDNA – DNA complementar

nt – nucleotídeo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. SOJA: IMPORTÂNCIA E CARACTERÍSTICAS	1
1.2. PERDAS NA PRODUTIVIDADE DA SOJA	2
1.2.1. Efeitos do estresse salino	2
1.3. OS MICRORNAS DE PLANTAS	3
1.3.1. Origem, biossíntese e mecanismo de ação de microRNAs	4
1.3.2. Os microRNAs como reguladores sob estresses ambientais	5
1.4. BIOINFORMÁTICA E AS NOVAS TECNOLOGIAS DE SEQUENCIAMENTO DE DNA	7
2. JUSTIFICATIVA	8
3. OBJETIVOS	9
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
4. MATERIAIS E MÉTODOS	9
4.1. MATERIAL BIOLÓGICO	9
4.2. EXPERIMENTO DE ESTRESSE SALINO	10
4.3. EXTRAÇÃO DE RNA	10
4.4. SÍNTESE DE cDNA	11
4.5. SEQUENCIAMENTO EM LARGA ESCALA (RNA-SEQ)	11
4.6. ANÁLISES DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE MICRORNAS E RNAS MENSAGEIROS	11
4.6.1 Bibliotecas de RNA-seq de pequenos RNAs	11
4.6.1 Bibliotecas de RNA-seq de mRNA	12
4.7. PREDIÇÃO DOS ALVOS DOS MICRORNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS	12
4.8. DESENHO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA PCR EM TEMPO REAL	13
4.9. ENSAIOS DE PCR EM TEMPO REAL	13
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
5.1 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE RNAs MENSAGEIROS SOB ESTRESSE SALINO (RNA-SEQ)	15
5.2 ANÁLISE DA EXPRESÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE MICRORNAS SOB ESTRESSE SALINO (RNA-SEQ)	17
5.3 PREDIÇÃO DE ALVOS PARA OS MICRORNAs DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS	21
5.4 ENSAIOS DE PCR EM TEMPO REAL	25

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	29
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

1. INTRODUÇÃO

1.1. SOJA: IMPORTÂNCIA E CARACTERÍSTICAS

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma planta pertencente à família Fabaceae, subfamília Faboideae e é originária da China. Foi introduzida no Brasil em 1882, na Bahia, e foi cultivada pela primeira vez no Rio Grande do Sul em 1900 (COSTA, 1996). A soja é uma planta anual, que possui ciclo de vida de 90 a 160 dias, de acordo com o genótipo. Normalmente adapta-se bem a temperaturas entre 20°C e 30°C (SCHNEPF et al, 2001).

A produção global de soja no ano de 2013 foi de mais de 276 milhões de toneladas de grãos, de acordo com a Food and Agriculture Organization (FAO, 2013), sendo esta uma das culturas de maior importância mundial. Neste contexto, o Brasil ocupa a segunda posição de maior produtor, perdendo apenas para os Estados Unidos. Na safra brasileira de 2013/2014, a cultura ocupou uma área de 30,1 milhões de hectares, totalizando uma produção de 85,6 milhões de toneladas (EMBRAPA SOJA, 2015). Mato Grosso é o estado que mais produz soja, seguido pelo Paraná e Rio Grande do Sul, respectivamente.

O desenvolvimento de variedades de soja geneticamente adaptadas às diferentes condições de clima, solo e latitude permitem o cultivo em todas as regiões do país. A soja é considerada uma planta de dia curto, ou seja, necessita um tempo de exposição ao sol menor para desencadear processos de floração e frutificação. O sucesso na produção brasileira deve-se ao desenvolvimento de plantas adaptadas a um fotoperíodo mais longo (SILVA, 2005). As culturas transgênicas também são importantes nesse contexto, aumentando o rendimento do produto final, reduzindo o custo de produção e facilitando o manejo (CELERES, 2013). Na safra 2012/2013, estudos apontam que 89,05% da área plantada correspondeu a cultivares de sojas transgênicas (CHÁVEZ; BARRETO, 2014).

A soja é uma fonte rica de proteínas e óleo vegetais, produzindo em média 40% e 20%, respectivamente. Esta leguminosa é utilizada na fabricação de ração animal, na alimentação humana, e também na produção de biodiesel (CLEMENTE;

CAHOON, 2009).

1.2. PERDAS NA PRODUTIVIDADE DA SOJA

As plantas são frequentemente expostas a condições ambientais desfavoráveis, que atuam como determinantes no rendimento da produção agrícola. Diversos fatores bióticos e abióticos são prejudiciais e afetam a cultura. Alguns exemplos de estresses abióticos são a diminuição da disponibilidade de água, exposição a temperaturas extremas (calor ou frio), diminuição dos nutrientes no solo ou excesso de íons tóxicos e excesso de luz (DUQUE; ALMEIDA; SILVA, 2013). Entre os fatores bióticos que limitam a obtenção de altos rendimentos na agricultura estão os agentes causais de doenças, tais como fungos, bactérias, vírus e nematóides, insetos, ácaros e plantas daninhas (BASF, 2013).

A seca e a salinidade são os dois principais estresses abióticos associados a uma grande diminuição no rendimento. De acordo com relatório elaborado pelo Ministério do Planejamento (GÖPFERT; ROSSETTI; SOUZA, 1993), a seca é indicada como sendo a principal causa de perdas no Brasil (71% dos casos). O estresse salino, por sua vez, afeta uma área de aproximadamente 800 milhões de hectares, que corresponde a 6% das terras cultivadas mundialmente (DONG et al., 2013).

A habilidade das plantas de se adaptar ou aclimatar a diferentes ambientes está relacionada com a plasticidade da fotossíntese, em combinação com outros processos, determinando o crescimento, desenvolvimento e reprodução. A principal característica de adaptação das plantas a estresses abióticos é a ativação de respostas múltiplas envolvendo uma rede complexa de interações gênicas. Vários estudos procuram compreender os processos adaptativos a níveis de organismo, fisiológico, bioquímico, celular e molecular (DUQUE; ALMEIDA; SILVA, 2013).

1.2.1. Efeitos do estresse salino

O estresse salino é um tipo de estresse abiótico que causa danos às plantas devido ao potencial osmótico e toxicidade iônica e afeta uma área de aproximadamente 800 milhões de hectares, que corresponde a 6% das terras cultivadas mundialmente (CRAMER et al., 2011; DONG et al., 2013). A salinidade diminui o conteúdo de água das células devido à diminuição do potencial externo da água, causado pelo aumento da concentração de íons (geralmente Na^+ e Cl^-), o que torna mais difícil a absorção de água pelas raízes e o transporte para as células metabolicamente ativas (DUQUE; ALMEIDA; SILVA, 2013).

Como efeito da perda de água e diminuição do volume celular, se observa uma diminuição do turgor celular e concomitante diminuição da expansão foliar e do crescimento da planta. Além disso, a planta começa a produzir osmólitos de baixo peso molecular (carboidratos, betaína e prolina) a fim de ajustar o potencial osmótico (DUQUE; ALMEIDA; SILVA, 2013).

Em nível molecular, as respostas das plantas a estresses abióticos envolvem interações entre diversas rotas metabólicas. Dois dos reguladores universais deste processo são os fitohormônios ácido abscísico (ABA) e etileno (GODA et al., 2008; SUN et al., 2013). Diversos fatores de transcrição têm expressão gênica alterada sob estresse salino, pois estes atuam sobre diversos genes modulando sua expressão (FAN et al., 2013). Neste contexto, os microRNAs mostram-se muito interessantes pois regulam a expressão de diversos genes alvos, incluindo fatores de transcrição, que respondem ao estresse salino (DONG et al., 2013).

1.3. OS MICRORNAS DE PLANTAS

Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNA não codificadores (18 a 25 nucleotídeos) que modulam a expressão gênica por mecanismos de silenciamento, através de inibição sequência-específica do RNA mensageiro alvo. Os estudos sobre microRNAs em plantas ganharam muito destaque na última década, devido ao seu papel regulatório sob diversos processos biológicos, tais como desenvolvimento e defesa contra estresse bióticos e abióticos (DEBAT; DUCASSE, 2014). Desta forma, os microRNAs consituem-se potenciais alvos para programas de melhoramento vegetal, a fim de melhorar o rendimento da produção agrícola (ZHOU; LUO, 2013).

1.3.1. Origem, biossíntese e mecanismo de ação de microRNAs

Acredita-se que os miRNAs surgiram antes mesmo do surgimento dos organismos multicelulares. Uma das evidências é o fato da alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* possuir miRNAs com as mesmas características que os de plantas superiores (SCHWACH et al., 2007). Um dos modelos atuais sugere que os miRNAs surgiram a partir de duplicações invertidas dos seus genes alvos, o que permitiria a formação de estruturas em forma de grampo (DEBAT; DUCASSE, 2014), características de precursores de miRNAs (Figura 1). Eventualmente, alguma mutação sítio-específica tornou o pareamento imperfeito, conforme observado na Figura 1.

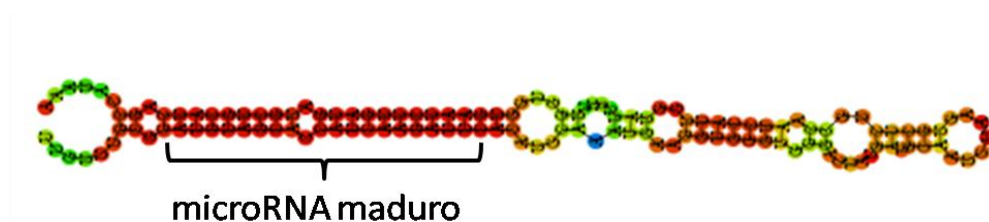


Figura 1: Estrutura em forma de “grampo”, característica do pré-miRNA. A região do pré-miRNA que corresponde ao microRNA maduro canônico está indicada na figura.

Diversos miRNAs são altamente conservados ao longo da evolução das plantas. No entanto, o surgimento de novas famílias de miRNAs não ocorreu em taxa constante, mas sim em momentos específicos. Acredita-se que este fato esteja ligado a episódios de evolução fenotípica, como a adaptação das plantas à vida terrestre (TAYLOR et al., 2014).

A maioria dos microRNAs derivam de exons ou íntrons de genes não codificadores (genes MIR), porém alguns estão localizados em íntrons de genes codificadores. Estes últimos recebem o nome de “mirtrons” (LAI, 2012; MENG; SHAO, 2012). Os promotores dos genes MIR possuem sítios de ligação a fatores de transcrição e dependem de um coativador transcricional (KIM et al., 2011).

Os lócus de microRNAs são transcritos em um longo RNA primário (pri-miRNA) pela ação da RNA polimerase II (LEE et al., 2004), portanto são poliadenilados e possuem 5’cap (DEBAT; DUCASSE, 2014; XIE et al., 2005). Os pri-miRNAs são transcritos longos, podendo conter até 3000 nucleotídeos, conforme

estudo conduzido com *Arabidopsis* (SZARZYNSKA et al., 2009). Em sua estrutura há uma região com conformação secundária na forma de um grampo (pre-miRNA), que é reconhecida e clivada na base do grampo por uma proteína da família de endoribonucleases de tipo III, DCL1 (MARGIS et al., 2006; ROGERS; CHEN, 2013). Esta proteína está associada com outras formando um complexo denominado RISC (Figura 2). Após a excisão do pré-miRNA, ocorrem clivagens subsequentes até se obter um RNAs de fita dupla pequenos (dsRNAs), composto pelo duplex miRNA:miRNA*, ou miRNA-5p/miRNA-3p, onde qualquer uma das fitas pode exercer seu papel biológico em diferentes condições. As proteínas da família DCL geram pequenos RNAs de diferentes tamanhos, sendo a DCL1 e a DCL4 responsáveis pela produção de RNAs de 21 nucleotídeos, a DCL2 por 22 nucleotídeos e a DCL3 por 24 nucleotídeos. A DCL1 é responsável pela produção da maioria dos microRNAs a partir dos genes MIR (ROGERS; CHEN, 2013).

As extremidades 3' do duplex miRNA:miRNA* são 2'-O-metiladas pela metiltransferase HEN1, com objetivo de estabilizar a estrutura. Após, ocorre a seleção da fita guia e ligação com a proteína AGO1, localizada no complexo RISC. A seleção da fita correta é ajudada pela proteína HYL1 e pelo regulador de HYL1, CPL1 (ROGERS; CHEN, 2013). O complexo miRNA e RISC é funcional e regula a expressão gênica dos genes alvos por degradação do RNA mensageiro ou por repressão da tradução (DEBAT; DUCASSE, 2014). O domínio PIWI da proteína AGO possui atividade endonuclease e é capaz de clivar RNAs mensageiros alvos que tenham complementaridade com o microRNA associado ao complexo protéico (LIU et al., 2004).

O panorama atual da compreensão dos mecanismos de biossíntese e degradação de microRNAs pode ser visualizado na figura 2.

1.3.2. Os microRNAs como reguladores sob estresses ambientais

Os microRNAs têm sido apontados como importantes reguladores em várias plantas sob estresse biótico e abiótico (KULCHESKI et al., 2011; SUNKAR; LI; JAGADEESWARAN, 2012). Foi verificado que muitos dos genes alvos preditos para microRNAs conhecidos tratam-se de proteínas regulatórias, sendo a maioria delas

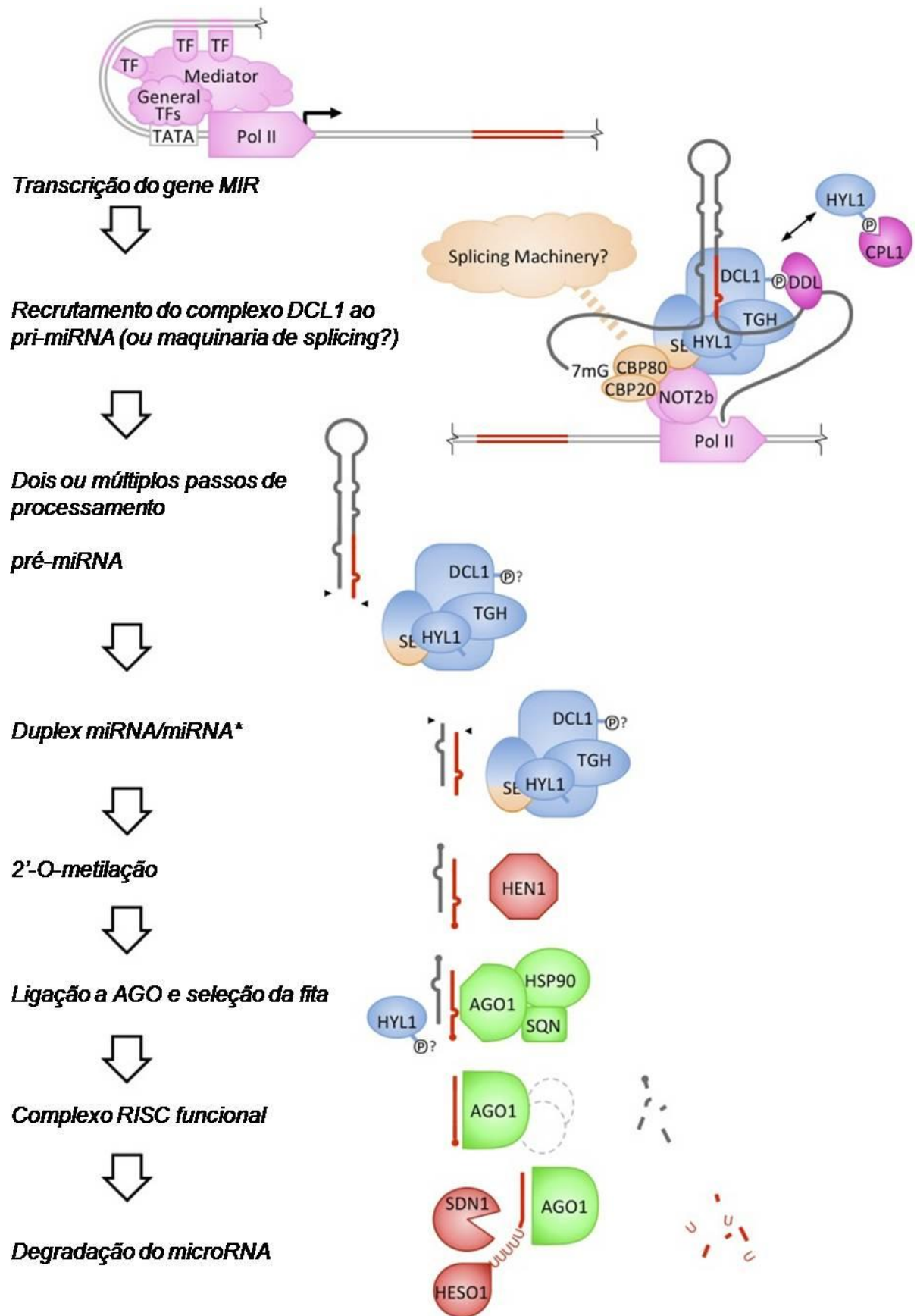


Figura 2: Visão global das principais etapas na biogênese e degradação de microRNAs em plantas. Adaptação de: (ROGERS; CHEN, 2013)

fatores de transcrição (FT) (JONES-RHOADES; BARTEL; BARTEL, 2006). Os FT são proteínas que possuem um domínio de interação com DNA e permitem o posicionamento correto da RNA polimerase no promotor dos genes alvos, ativando ou reprimindo a transcrição. Portanto, os microRNAs, assim com os fatores de transcrição, podem ser considerados reguladores centrais da expressão gênica e são pesquisados como importantes genes alvos para melhoramento vegetal (ZHOU; LUO, 2013).

Conforme o trabalho de Ni et al. (2012), o microRNA de soja mir394a foi caracterizado como responsivo a estresses ambientais tais como seca, alta salinidade, baixas temperaturas e tratamento com ácido abscísico e foi superexpresso em *Arabidopsis thaliana*, gerando plantas com perda de água pelas folhas diminuída e maior tolerância à alta salinidade (NI et al., 2012). Outro trabalho analisou a dinâmica de regulação de microRNAs envolvidos em resposta a estresses salinos em nódulos de soja por sequenciamento de nova geração, obtendo 47 miRNAs com expressão aumentada e 46 com expressão diminuída (DONG et al., 2013). No entanto, são necessários mais estudos com objetivo de analisar os efeitos dos estresses abióticos sob os microRNAs a fim de compreender de forma mais ampla os mecanismos envolvidos nesta regulação.

1.4. BIOINFORMÁTICA E AS NOVAS TECNOLOGIAS DE SEQUENCIAMENTO DE DNA

As novas técnicas de sequenciamento de DNA trouxeram uma diminuição no custo e um aumento na quantidade de sequências obtidas em relação ao sequenciamento de Sanger, tornando fácil e acessível o sequenciamento de genomas, estudos de metagenômica, transcriptômica (RNA seq), entre outras aplicações (METZKER, 2009; MUERS, 2011). A tecnologia de sequenciamento mais utilizada na atualidade é a Illumina, que usa terminadores de cadeia reversíveis marcados com diferentes fluoróforos, sendo um para cada nucleotídeo, portanto em cada ciclo a adição de um nucleotídeo é identificada pela emissão de fluorescência (METZKER, 2009).

As novas tecnologias permitem o estudo de expressão gênica em nível global

(RNA seq), gerando uma enorme quantidade de *reads*. Para o processamento e análises destes dados, foram desenvolvidas diversas ferramentas de bioinformática, tais como o TopHat, que é um alinhador de sequências que identifica junções de splicing, o Cufflinks, que faz análises estatísticas de dados de RNA-seq, e o HTSeq, que é um pacote de ferramentas para o processamento de dados de sequenciamento (ANDERS; PYL; HUBER, 2015; TRAPNELL et al., 2012). Com estas ferramentas, é possível analisar várias amostras e comparar a expressão gênica entre elas. Além disso, diversos bancos de dados possuem dados de expressão gênica, tal como o Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).

Os microRNAs tem sido muito estudado nos últimos anos e diversas ferramentas de bioinformática foram desenvolvidas para auxiliar no estudo de pequenos RNAs. Bancos de dados, tais como o miRBase, são repositórios de sequências de microRNAs e precursores conhecidos de plantas (MIRBASE, 2015). Já o banco de dados PMTED disponibiliza informação sobre a expressão de genes alvos de microRNAs obtidos por ensaios de microarranjo (PMTED, 2015). Outras ferramentas, por sua vez, predizem os genes alvos pela complementaridade entre o microRNA e o gene e pela análise da acessibilidade. Um exemplo é o servidor online psRNATarget, específico para plantas (DAI; ZHAO, 2011). Devido à importância dos microRNAs em diversos processos biológicos, diversas ferramentas têm sido criadas e disponibilizadas para a comunidade científica.

2. JUSTIFICATIVA

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja e boa parte da produção é perdida por danos durante a produção ou na colheita e transporte dos grãos. O estresse salino causa danos muito severos às plantas, diminuindo o crescimento e a produtividade. Em torno de 6% das terras cultivadas mundialmente possui alta concentração de sais (DONG et al., 2013), portanto existe uma grande preocupação na obtenção de espécies vegetais mais adaptadas a esta situação adversa.

É necessário que as perdas sejam diminuídas ao mínimo e, para tal fim, as plantas melhoradas geneticamente com maior tolerância às condições ambientais

possuem um papel importante. No entanto, a obtenção de novos conhecimentos que permitam o melhoramento e a manipulação genética de plantas ainda é um grande desafio para a agricultura moderna (LE et al., 2007). Portanto, compreender os mecanismos de respostas das plantas em situação de estresse permite a identificação de genes potenciais para programas de melhoramento.

3. OBJETIVOS

Analisar a expressão gênica diferencial de microRNAs maduros e de seus potenciais genes alvos em resposta ao estresse salino em folhas de soja.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a expressão gênica diferencial de microRNAs de folha de soja presentes nas bibliotecas de sequenciamento de pequenos RNAs sob estresse salino;
- Analisar a expressão gênica diferencial das bibliotecas de sequenciamento de RNAs mensageiros de folhas de soja sob situação de estresse salino;
- Predizer genes alvos para os microRNAs diferencialmente expressos e comparar a abundância de transcritos;
- Confirmar os dados de expressão gênica obtidos por RT-qPCR.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAL BIOLÓGICO

O material biológico utilizado foram plantas de soja (*Glycine max*) do cultivar Conquista.

4.2. EXPERIMENTO DE ESTRESSE SALINO

O primeiro experimento de estresse salino foi realizado a fim de obter amostras de RNA para sequenciamento de larga escala. As sementes de soja foram pré-germinadas em papel filtro no escuro a temperatura de aproximadamente 25°C e posteriormente transferidas para sistema hidropônico contendo água em câmara de crescimento a 25-28°C e umidade de aproximadamente 40%. As plântulas trifolioladas com 15 dias foram transferidas para uma solução de 200mM de NaCl. Foram coletadas amostras de folha das plantas de soja após 4h de estresse salino e estas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Após, estas amostras foram submetidas a extração de RNA.

O segundo experimento foi realizado a fim de confirmar os resultados obtidos no RNA-seq. As plantas de soja foram germinadas em terra e, após 7 dias, foram transferidas para meio hidropônico com solução nutritiva de Hoagland. As plantas foram dispostas em suportes de isopor dentro de potes plásticos, de forma que as raízes ficassem totalmente submersas na solução. Após 15 dias de crescimento a 25-28°C e umidade de aproximadamente 40%, plântulas foram incubadas em solução de Hoagland com adição de 200mM de NaCl e plantas controles foram transferidas para uma nova solução de Hoagland sem adição extra de sal. Foram coletadas amostras de folhas de 6 plântulas de soja (replicatas biológicas) para cada um dos pontos da cinética compostas por 1, 4 e 24h de incubação), as quais foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente submetidas à extração de RNA.

4.3. EXTRAÇÃO DE RNA

A extração de RNA foi realizada com o reagente Trizol (Invitrogen), de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante. As amostras do segundo experimento de estresse salino, após a extração de RNA, foram tratadas com DNase (Promega), de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante.

4.4. SÍNTESE DE cDNA

A síntese de cDNA foi realizada com a enzima transcriptase reversa M-MLV (Promega), seguindo protocolo do fabricante. Para a síntese de cDNA de mRNA, foi utilizado o oligonucleotídeo oligoT24V, complementar à cauda poli-A dos mRNA expressos (5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV-3'), onde o "V" da sequência corresponde a qualquer um dos três nucleotídeos: A, C ou G.

4.5. SEQUENCIAMENTO EM LARGA ESCALA (RNA-SEQ)

Para o sequenciamento em larga escala, foram enviados aproximadamente 10µg de RNA para a empresa FASTERIS S.A. (Genebra, Suíça). Foram sequenciadas bibliotecas de mRNA e de pequenos RNAs e controles em duplicata pela plataforma HiSeq2000 da Illumina.

As bibliotecas de pequenos RNAs tiveram *reads* de até 44 nt. Basicamente, o processo de sequenciamento de sRNAs pelo Illumina consiste nas seguintes etapas: eletroforese e purificação de banda de RNA correspondente a cerca de 15 a 40 nt em gel de poliacrilamida; ligação de adaptadores nas extremidades 5' e 3' do RNA; purificação em gel de poliacrilamida; síntese de cDNA; amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), formando "colônias de DNA" e sequenciamento Illumina.

As bibliotecas de mRNA, por sua vez, eram *pair end* com *reads* de 50 nucleotídeos. O processo de sequenciamento se baseia na síntese de cDNA, seguida pela ligação a adaptadores nas extremidades 5' e 3' do RNA, amplificação por PCR e formação de "colônias de DNA", e sequenciamento Illumina.

4.6. ANÁLISES DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE MICRORNAS E RNAs MENSAGEIROS

4.6.1 Bibliotecas de RNA-seq de pequenos RNAs

As primeiras etapas foram realizar uma análise de qualidade nas bibliotecas

de pequenos RNAs, a fim de eliminar os *reads* de baixa qualidade utilizando as ferramentas Fastx. Posteriormente foi feita uma filtragem utilizando Bowtie para remover os *reads* correspondentes a RNA ribossomal, RNA transportador, RNA cloroplastídico e RNA mitocondrial.

A fim de analisar a expressão gênica de microRNAs, foram reunidas todas as sequências de pré-miRNAs conhecidos de soja que estão disponíveis no miRBasev.18. Após, foi realizado um ancoramento dos *reads* das bibliotecas de sequenciamento de pequenos RNAs nestas sequências de pre-miRNAs conhecidos, utilizando a ferramenta isomirID (VALTER DE OLIVEIRA; CHRISTOFF; MARGIS, 2013). Considerou-se que todos os *reads* que ancoraram nas sequências de pré-miRNA (com *Cutoff* de 20) correspondessem a microRNAs. Portanto, foi obtida uma tabela com o número de *reads* correspondentes a microRNAs em cada biblioteca. Este resultado foi submetido à análise estatística de expressão gênica diferencial pelo pacote DESeq2 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014) no ambiente R.

4.6.1 Bibliotecas de RNA-seq de mRNA

As bibliotecas de mRNA foram analisadas em relação à qualidade do sequenciamento, utilizando ferramentas do pacote Fastx. Após, os *reads* foram ancoradas no genoma de soja (disponível no Phytozome v.10) utilizando a ferramenta TopHat2 (aceitando até dois mismatches) e a contagem de *reads* correspondentes a cada gene foi feita com HTSeq-count (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014). O resultado também foi submetido a análises estatísticas com o pacote DESeq2.

Após, os genes diferencialmente expressos foram submetidos a análises funcionais com o software BLAST2GO, a fim de identificar os processos biológicos e as funções moleculares que estariam envolvidos. Os resultados foram processados e foi organizado um gráfico de barras com os resultados.

4.7. PREDIÇÃO DOS ALVOS DOS MICRORNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS

Foi realizada uma predição de genes alvos para os 87 microRNAs diferencialmente expressos (nível de significância de 10^{-5}) utilizando a ferramenta online psRNATarget (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>). Foram utilizados os valores padrões na busca, alterando somente o valor de “expectância máxima” para 3.0. O valor de expectância refere-se ao escore de complementaridade entre o pequeno RNA e o transcrito alvo; quanto menor, mais provável que seja real a interação.

Em seguida, foi organizada uma tabela relacionando os microRNAs e seus alvos preditos que apresentassem um perfil de expressão gênica inverso no tratamento salino. Destes, foram selecionados 3 microRNAs e seus respectivos genes alvos com funções interessantes para dar continuidade aos estudos. Foi realizada uma busca pelos genes homólogos aos genes alvos selecionados e foram identificados quais homólogos também poderiam ser alvos do microRNA, utilizando a ferramenta psRNATarget.

4.8. DESENHO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA PCR EM TEMPO REAL

Para os mRNA mensageiros alvos identificados com o psRNATarget, foram projetados oligonucleotídeos específicos utilizando a ferramenta Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>). Utilizou-se como padrão para os oligonucleotídeos desenhados, a temperatura média de anelamento de cerca de 60°C e a amplificação de fragmentos entre 100 e 250 nucleotídeos, conforme indicado na tabela 1. Não foi necessário desenhar primers para os genes normalizadores pois estes já estavam disponíveis no laboratório (Tabela 1).

4.9. ENSAIOS DE PCR EM TEMPO REAL

Os experimentos de PCR em tempo real (RTqPCR) foram realizados no aparelho Applied Bioscience 9500, utilizando o protocolo com o fluoróforo intercalante SYBR Green. Os experimentos foram realizados em quintuplicata biológica e triplicata técnica.

Para os ensaios de RTqPCR de RNAs mensageiros, foram testados 4 genes normalizadores previamente validados (HU et al., 2009), descritos na tabela 1. Os normalizadores utilizados foram ACT (Glyma.18G290800), que é uma proteína de estruturação do citoesqueleto; CYP2 (Glyma.12G024700), que é uma proteína relacionada à processos de dobramento de proteínas; ELF1B (Glyma.02G276600), que é uma proteína relacionada com a elongação traducional; TUA (Glyma.05G157300), que é uma proteína de estruturação de citoesqueleto. Os melhores normalizadores foram escolhidos com auxílio da ferramenta geNorm, que deveriam apresentar o valor médio de estabilidade de expressão menor que 0,15.

Tabela 1: Sequências dos oligonucleotídeos dos genes alvos preditos para os microRNAS 172k, 5371 e 1512abc e genes normalizadores

Gene	Oligonucleotídeo Direto (5' - 3')	Oligonucleotídeo Reverso (5' - 3')
Glyma.08g288600	GAAGCAAGTCACTTGTCTGCA	TTAACTTCAACAATATGCTGG
Glyma.18g136200	GAAGCAAGTCACTTATCTGCG	TTAACTTCAACAATATGCTGA
Glyma.01g031900	CATCTAAGCCAAAGCCAAGG	GCCATTAAAAACCCGTTTCAG
Glyma.06g184200	TGGTAGCAGCAGCTTTAGGTC	CATCCATGTATAATATAAACCCAACG
Glyma.04g180900	GAATATTGGTAGCAGCTTTAGGTC	AAAAACCCAACGAGTCCAAAT
Glyma.02g291100	GCAATCAAATCCAACAACCTTA	GCATAGATCTCATTGACCTTCTTA
Glyma.14g023600	TTCATTGGCCGCCAGAGTG	AGGTGCCCCTTCTGTTTGAACAT
Glyma.02g234300	ATTGAATTCAGGGCCAGATG	ATCGCTCTTTAACTGCTCCAA
ACT	CGGTGGTTCTATCTTGGCATC	GTCTTTCGCTTCAATAACCCTA
CYP2	CGGGACCAGTGTGCTTCTTCA	CCCCTCCACTACAAAGGCTCG
ELF1B	GTTGAAAAGCCAGGGGACA	TCTTACCCCTTGAGCGTGG
TUA	AGGTCGGAAACTCCTGCTGG	AAGGTGTTGAAGGCGGTCTG

A quantificação da expressão gênica relativa foi calculada com o método matemático $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). A significância estatística foi obtida com auxílio do programa estatístico SSPS, pela análise de ANOVA, um fator, com o teste de Tuckey considerando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estresse salino é altamente prejudicial para as plantas, diminuindo o

crescimento e a produtividade. Alterações fenotípicas são observadas em plantas submetidas ao estresse, tais como o surgimento de manchas esbranquiçadas nas folhas pela diminuição da produção de clorofila (clorose) e posterior queda (LOMGSTRETH; NOBEL, 1979). Ao realizar o ensaio de estresse salino com 200mM de NaCl, foi observado o desenvolvimento de clorose após 24h (Figura 3). Além disso, foi observada uma leve diminuição do turgor celular devido ao potencial osmótico.

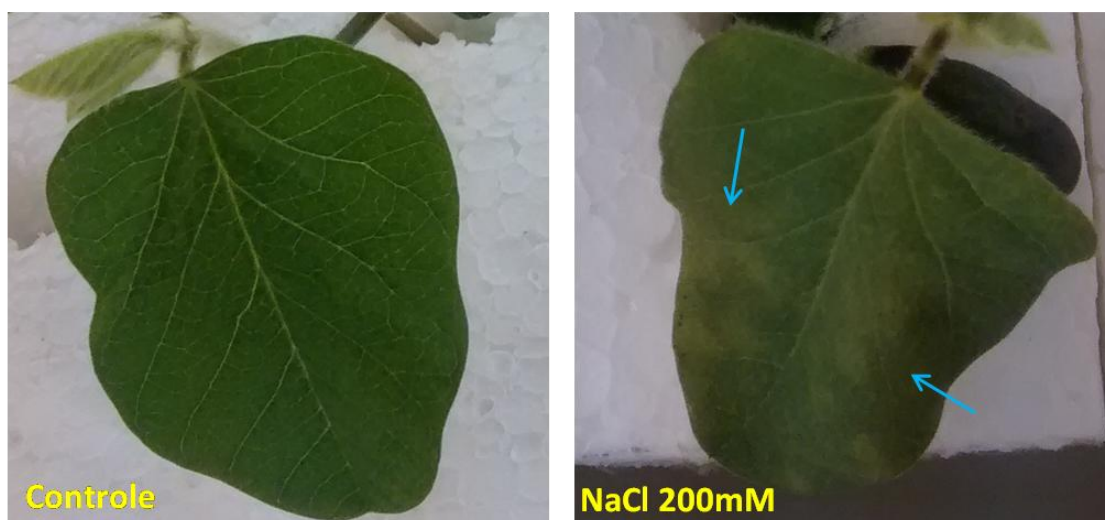


Figura 3: Surgimento de manchas de clorose (setas azuis) após 24h de estresse salino.

5.1 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE RNAs MENSAGEIROS SOB ESTRESSE SALINO (RNA-SEQ)

A fim de compreender os mecanismos de respostas da soja ao estresse salino, foram feitas bibliotecas de RNA-seq de plantas tratadas por 4 horas com 200 mM de NaCl e de plantas controle. As bibliotecas de RNA-seq eram *pair end* e em duplicata. Em cada biblioteca, foram obtidos mais de 24 milhões de *reads* (Tabela 3).

Os *reads* das bibliotecas foram ancorados no genoma de soja disponível no Phytozome, utilizando o software TopHat2 (Tabela 4). Para as etapas seguintes, foram utilizados somente os *reads* que ancoraram uma única vez no genoma e que os respectivos pares alinhasssem (já que as bibliotecas eram *pair end*). A frequência de *reads* de cada gene foram obtidas com HTseq-count.

Após, as bibliotecas foram submetidas a análises estatísticas e foram obtidos 3726 genes diferencialmente expressos no tratamento salino, utilizando valor-p de 0,01 e valor de *fold change* maior que 2. Destes, 2013 genes tiveram sua expressão aumentada pelo tratamento salino e 1713 diminuída. O número de genes responsivos em folhas é significativamente maior que o identificado por Fan e colegas (2012), no qual 2194 genes apresentaram expressão diferencial sob estresse com 120mM de NaCl.

Tabela 2: Número de reads das bibliotecas de RNA-seq de RNA mensageiros.

Nome da biblioteca	Tipo	Número total de reads
GEK 37-1	LC1- Controle	25604101
GEK37-2	LC1- Controle	25604101
GEK38-1	LC2- Controle	24420758
GEK38-2	LC2- Controle	24420758
GEK39-1	LT1 – Tratamentosalino	30787923
GEK39-2	LT1 – Tratamentosalino	30787923
GEK40-1	LT2 –Tratamentosalino	28970889
GEK40-2	LT2 –Tratamentosalino	28970889

Tabela 3: Dados do alinhamento das bibliotecas de RNA-seq no genoma da soja.

Amostra	Número total de reads	Taxa de mapeamento de reads no genoma	Número de pares alinhados	Taxa de alinhamento correto de pares
LC1	25604101	96.1%	23911722	88.0%
LC2	24420758	96.1%	22905046	87.9%
LT1	30787923	96.4%	28953560	89.2%
LT2	28970889	96.7%	27356672	88.9%

Após, foi realizada uma análise funcional a fim de identificar os processos biológicos e a funções moleculares dos genes diferencialmente expressos (Figura 4). Em relação aos processos biológicos, observa-se que os processos metabólicos primários, processos metabólicos celulares e processos metabólicos de substâncias orgânicas foram os mais afetados, no entanto apresentaram um perfil semelhante de genes com expressão aumentada e expressão diminuída. Alguns processos, por sua

vez, apresentaram ocorrência muito maior de genes com expressão aumentada, tais como respostas a estímulos bióticos, respostas a estímulos externos, respostas a estímulos endógenos e resposta a estresses. Isso indica que a planta possivelmente estava regulando seu estado metabólico a fim de se aclimatar à alta quantidade de sal.

Na categoria função molecular, se observa ocorrência muito maior de genes com função de ligação a sequências específicas de DNA (fatores de transcrição), o que é esperado, pois são considerados reguladores globais. Além disso, também há abundância maior de genes com expressão aumentada com função de ligação a compostos heterocíclicos, ligação a compostos orgânicos cíclicos, ligação a pequenas moléculas e atividade de transferases. Genes com função de hidrolase foram, em geral, reprimidos pelo estresse. Estas alterações de perfil são esperadas para plantas sob estresse e resultados similares foram observados em outros estudos (FAN et al., 2013).

5.2 ANÁLISE DA EXPRESÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE MICRORNAS SOB ESTRESSE SALINO (RNA-SEQ)

Foram obtidas bibliotecas de RNA-seq de pequenos RNAs a fim de buscar os microRNAs diferencialmente expressos com tratamento salino (200mM de NaCl). Observa-se que cada biblioteca apresentou mais de 6 milhões de *reads* (Tabela 5). Primeiramente, foram removidos os *reads* correspondentes a RNA ribossomal, RNA transportador, RNA cloroplastídico e RNA mitocondrial e também foi analisado a quantidade de *reads* correspondentes a microRNAs conhecidos (depositados no miRBase v.18). A tabela 5 relaciona a quantidade e porcentagem de *reads* correspondentes a cada tipo de RNA. Nota-se que há uma grande quantidade de RNA ribossomal, o que indica que a purificação não foi tão boa.

Após as análises estatísticas, foram obtidos 229 microRNAs diferencialmente expressos no tratamento salino, utilizando nível de significância de 0,01. No entanto, para fins práticos, foi determinado um nível de significância de 10^{-5} como linha de corte e foram obtidos 87 microRNAs diferencialmente expressos. Estes foram submetidos à análise de predição de alvos.

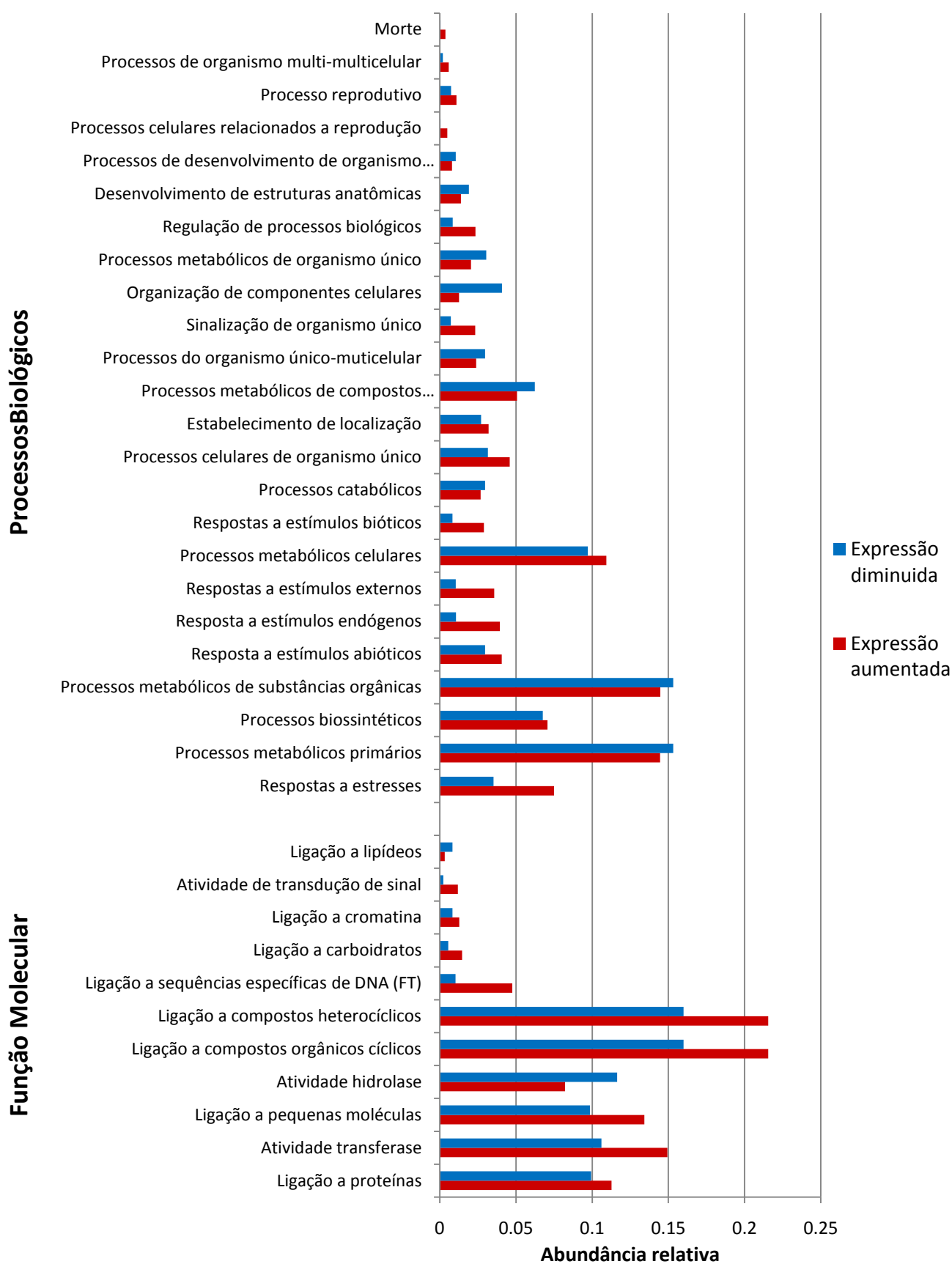


Figura 4: Categorização funcional dos genes diferencialmente expressos em folhas de soja.

Tabela 4: Número de reads e porcentagem correspondente a cada tipo de RNA descrito. mtRNA: RNA mitocondrial; cpRNA: RNA cloroplastídico; rRNA: RNA ribossomal; tRNA: RNA transportador.

Número de reads e porcentagem							
Nome da biblioteca	Tipo	miRNAs conhecidos	mtRNA	cpRNA	rRNA	tRNA	Total
GEK29	Controle 1	928868	44145	378324	2668250	7472	7816892
		(11.88%)	(0.56%)	(4.85%)	(34.13%)	(0.10%)	
GEK30	Controle 2	892325	36332	456911	2937014	8007	8034081
		(11.11%)	(0.45%)	(5.69%)	(36.56%)	(0.10%)	
GEK31	Tratamento 1	714425	85637	32364	4169415	10859	8085412
		(8.84%)	(1.06%)	(0.40%)	(51.57%)	(0.13%)	
GEK32	Tratamento 2	696191	49266	25404	3721413	7739	6627897
		(10.50%)	(0.74%)	(0.38%)	(56.15%)	(0.12%)	

A figura 5 apresenta um mapa de calor relacionando a expressão gênica destes microRNAs selecionados. É possível observar que não há uma grande variação entre as replicatas e que na maioria dos casos, os microRNAs diminuíram sua expressão devido ao tratamento. É possível que isso ocorra devido ao importante papel regulador dos microRNAs em situações de estresse abiótico (JONES-RHOADES; BARTEL; BARTEL, 2006; LE et al., 2012; NI et al., 2012; XIE et al., 2014; ZHANG et al., 2013), indicando que estes podem regular a expressão de genes relacionados com tolerância a estresses ambientais, diminuindo sua expressão e permitindo que esses genes exerçam suas funções.

Observam-se que em alguns casos, não é possível determinar com precisão de qual locus determinado microRNA deriva, como no caso do mir1512 (a,b,c). Os *reads* podem ter sido originados em qualquer um dos três pre-miRNAs. Outro caso interessante é a ocorrência de isomirRNAs, ou seja, microRNAs que diferem do canônico, que está depositado no miRBase (MORIN et al., 2008). Um exemplo disso é o mir5371, que apresenta duas isoformas diferencialmente expressas, sendo a primeira derivada da posição 26 a 47 do pré-miRNA (AGGAATTAGTCACTCAGATCC) e a segunda derivada da posição 25 a 46 (TAGGAATTAGTCACTCAGATC).

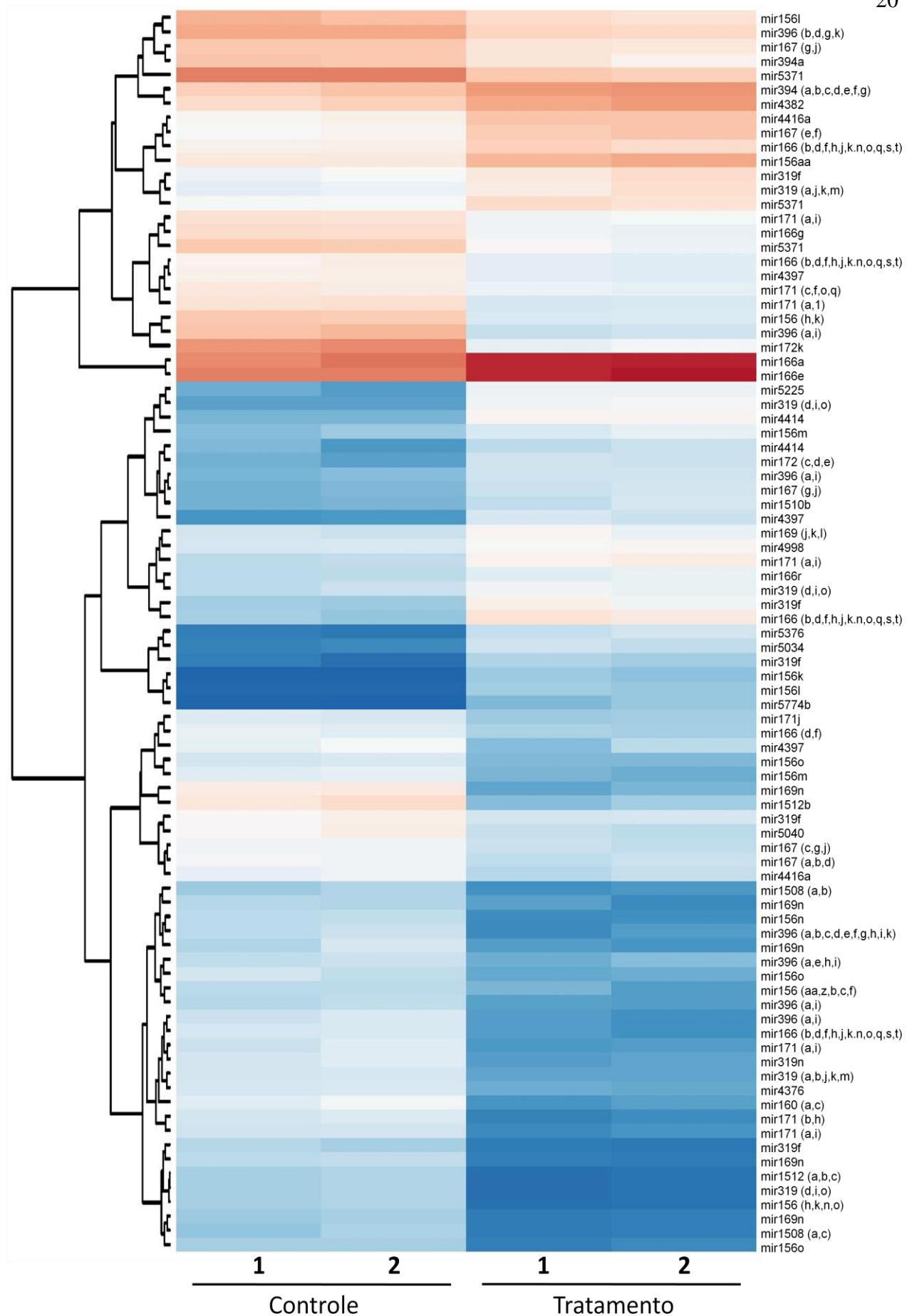


Figura 5: Mapa de calor relacionando os dados de expressão gênica de cada microRNA selecionado. Quanto mais vermelho, maior expressão; quanto mais azul, menor expressão.

5.3 PREDIÇÃO DE ALVOS PARA OS MICRORNAs DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS

Utilizando a ferramenta psRNATarget, foi realizada uma predição de alvos para os 87 microRNAs diferencialmente expressos. Foram obtidos 299 genes alvos potenciais. Apesar do valor alto, 16 microRNAs não apresentaram genes alvos.

Os dados de expressão gênica dos microRNAs e dos genes alvos preditos foram organizados e foram selecionados somente os microRNAs e respectivos alvos que apresentassem correlação inversa, pois este é um indício de que o microRNA possa ser de fato regulador do gene alvo. A tabela 6 apresenta os dados dos microRNAs que tiveram expressão diminuída e seus respectivos alvos aumentada, enquanto a tabela 7 apresenta os dados da situação reversa

Na tabela 6, foi observado que alguns microRNAs diminuíram drasticamente a expressão gênica no tratamento salino, chegando a reduzir 136 vezes, como no caso do miRNA4414. A variação dos genes alvos, no entanto, não foi tão grande quanto dos microRNAs, o que é esperado, já que os microRNAs são considerados reguladores globais e devem agir rapidamente em situações de estresse.

Em relação às funções dos genes alvos preditos, foram vistos alguns fatores de transcrição, como já observado por outros autores (JONES-RHOADES; BARTEL; BARTEL, 2006; XIE et al., 2014). Um dos fatores de transcrição obtidos foi a proteína NAM (No Apical Meristem), que regula a embriogênese, mais especificamente o desenvolvimento e degeneração do tegumento do óvulo. No trabalho de Zhou e colegas (2007) com arroz, foi verificado que o gene NAM estava com sua expressão aumentada especificamente sob de estresse salino, e diminuída sob estresse hídrico, indicando que este fator de transcrição possui um papel importante na tolerância ao excesso de sal (ZHOU et al., 2007). Os genes Glyma.13G274900, Glyma.04G197100 e Glyma.08G011500 estão anotados como fatores de transcrição com domínio SBP (*squamosa binding protein*) e foram preditos como alvos da família do microRNA 156. As proteínas SBP estão envolvidas no desenvolvimento foliar, mudança para a fase vegetativa, desenvolvimento de flor e fruto, arquitetura da planta e formação de esporos (CHEN et al., 2010).

Tabela 5: MicroRNAs e respectivos alvos preditos com padrão de expressão inverso. FT: Fator de Transcrição.

Sequência	miRNA	Fold Change miRNA	Valor-p miRNA	Alvos	Fold Change Alvo	Valor-p alvo	Função
AGCTGCTGACTCGTTGGCTCG	4414	-136,24	6.04e-07	Glyma.05G073200	+1,61	0,04467	Enzima lipolítica
GGAGCATCATCAAGATTCAACA	Família 172 (c,d,e)	-59,71	5.44e-14	Glyma.15G257700	+2,61	0,02012	FT – Proteína NAM (No Apical Meristem)
				Glyma.11G192900	+2,39	0,00004	Proteína com domínios ring finger e CHY zinc finger - C3HC4
				Glyma.02G234300	+2,07	0,00106	U-box E3-Ligase
TAGGAATTAGTCACTCAGATC	5371	-50,21	2.16e-12	Glyma.08G288600	+2,04	0,00064	Trealose-6-fosfato sintase
TGAATCTTGATGATGCTGCAT	172k	-36,00	2.44e-09	Glyma.14G156200	+1,65	0,03225	Proteína de repetições WD40
				Glyma.20G140200	+1,92	0,00395	Serina/treonina quinase
GGGATATTGGTCCGGTTCAATA	Família 171 (a,i)	-29,65	6.58e-13	Glyma.11G231400	+2,47	0,00039	Proteína contendo motivo dedo de zinco - C3HC4
GCTCTCTAGGCTTCTGTCATCC	156m	-14,32	1.98e-12	Glyma.15G024800	+2,11	0,00127	ATPase Apoptótica
AGCTCTGTGGCTACACTTTG	394a	-14,03	3.34e-07	Glyma.11G231400	+2,47	0,00039	Proteína contendo motivo dedo de zinco - C3HC4
GCTCTCTAGGCTTCTGTCATC	156m	-13,93	5.49e-06	Glyma.15G046500	+3,28	9.81e-05	Sem função definida
GGAATGGTGTCTGTGTCGAGA	Família 166 (d,f)	-5,54	5.90e-08	Glyma.16G008400	+1,82	0,00317	Guanosina polifosfato pirofosfolidrolase/sintase
TGAAGATTGAAGAATTTGGGA	5376	-4,53	1.12e-06	Glyma.13G035800	+1,69	0,02060	Serina/treonina quinase
				Glyma.13G274900	+2,72	0,03009	FT - Proteínas domínio SBP
TTGACAGAAAGAGGTGAGCAC	Família 156 (h,k,n,o)	-4,38	3.37e-06	Glyma.04G197100	+2,36	0,00203	FT - Proteínas domínio SBP
				Glyma.08G011500	+2,27	0,03419	FT - Proteínas domínio SBP
TGGACTGAAGGAGCTCCCTT	Família 319 (a,b,j,k,m)	-4,03	3.34e-06	Glyma.02G024400	+1,79	0,00526	Serina/treonina quinase

Tabela 6: MicroRNAs e respectivos alvos preditos com padrão de expressão inverso. FT: Fator de Transcrição.

Sequência	miRNA	Fold Change miRNA	Valor-p miRNA	Alvos	Fold Change Alvo	Valor-p alvo	Função
GTCGGACCAGGCTTCATTCCC	166a	+5,06	1.48e-07	Glyma.06G086600	-2,44	0,00003	FT - Proteína homeobox-ziper de leucina
				Glyma.09G023600	-2,29	0,00007	FT - Proteína homeobox-ziper de leucina
				Glyma.15G129700	-1,65	0,01452	FT - Proteína homeobox-ziper de leucina
GCGTATGAGGAGCCAAAGCATA	Família 160 (a,b)	+5,17	4.69e-07	Glyma.15G274000	-2,55	0,00151	Transcriptase reversa de telômeros
				Glyma.08G155900	-2,31	0,01851	Transcriptase reversa de telômeros
TCGGACCAGGCTTCATTCCCT	166r	+5,86	6.66e-11	Glyma.06G086600	-2,43	0,00003	FT - Proteína homeobox-ziper de leucina
				Glyma.09G023600	-2,29	0,00007	FT - Proteína homeobox-ziper de leucina
				Glyma.15G129700	-1,65	0,01452	FT - Proteína homeobox-ziper de leucina
GCTTTAAGAAATTCAGTTATG	Família 1512 (a,b,c)	+119,43	2.01e-06	Glyma.02G291100	-1,63	0,02686	Endoribonuclease L-PSP
				Glyma.14G023600	-1,57	0,04358	Endoribonuclease L-PSP

Também há ocorrência de serina/treonina quinases, que estão envolvidas na ativação de cascatas intracelulares que respondem a aclimação bioquímica e fisiológica em diversas situações de estresse, o que indica que estes podem ser bons alvos para melhoramento genético (ZHAO et al., 2009). A U-box E3 ligase é uma enzima que seleciona e marca especificamente proteínas para ubiquitinação e posterior degradação (AZEVEDO et al., 2001; METZGER et al., 2014). Alguns trabalhos já indicaram que a degradação protéica mediada por ubiquitina/proteassomo possui papel fundamental na homeostase de Ácido Abscísico (ABA) e respostas a estresses abióticos (MAZZUCOTELLI et al., 2008). Já a trealose-6-fosfato sintase, por sua vez, é uma enzima envolvida na produção de trealose, um dissacarídeo conhecido por proteger osmoticamente as membranas celulares durante desidratação (DUQUE; ALMEIDA; SILVA, 2013; GARG et al., 2002). A superexpressão desta enzima aumenta a tolerância das plantas de arroz a estresses abióticos (DENG; WANG, 2011). Esta enzima é predita como gene alvo do microRNA172k, sendo esta a primeira vez em que há indícios de uma regulação pós-transcricional mediada por microRNA.

Outros genes alvos preditos que aumentaram a sua expressão com o tratamento salino foram a enzima guanossina polifosfato pirofosfohidrolase/sintase, que está envolvida no metabolismo de ácidos nucleicos; ATPase apoptótica, que está envolvida em processos de morte celular programada que normalmente é induzido em plantas sob estresse (ARAVIND; DIXIT; KOONIN, 1999); proteínas com domínios dedo RING e dedo de zinco tipo CHY (C3HC4), que possuem capacidade de se ligar a zinco e podem estar relacionadas com ubiquitinação (JOAZEIRO; WEISSMAN, 2000); proteína de repetições WD40, que está implicada em diversas funções tais como a transdução de sinal, regulação da transcrição, controle do ciclo celular, apoptose e autofagia (STIRNIMANN et al., 2010).

A tabela 7 apresenta os microRNAs com expressão aumentada no tratamento salino, que são em menor número. Um microRNA oriundo da família 1512 teve uma variação expressiva, chegando a um aumento de quase 120 vezes. Este microRNA possui como alvo predito a enzima endoribonuclease L-PSP, que está relacionada com a clivagem de mRNA e inibição da síntese protéica (GUTIÉRREZ; MACINTOSH; GREEN, 1999). É possível observar na tabela 6 que três genes com expressão diminuída são fatores de transcrição homeobox-zíper de leucina, que estão relacionados com o crescimento e desenvolvimento vegetal e respostas a

estresses ambientais (BELAMKAR et al., 2014). Conforme Belamkar e colegas (2014), 20 genes desta família de fatores de transcrição são responsivos ao estresse salino e estresse por seca em soja. Além disso, outro gene identificado foi a enzima telomerase, que teve expressão diminuída em mais de duas vezes, indicando que o desenvolvimento da planta foi afetado pelo estresse salino (DUQUE; ALMEIDA; SILVA, 2013)

Destas duas tabelas, foram selecionados três microRNAs e respectivos genes alvos que apresentassem função interessante para aprofundar os estudos, sendo eles o mir172k, mir5371 e mir1512abc e seus respectivos alvos trealose-6-fosfatossintase, U-box E3 ligase e endoribonuclease L-PSP.

5.4 ENSAIOS DE PCR EM TEMPO REAL

Os ensaios de PCR em tempo real foram realizados a fim de confirmar os dados de expressão gênica obtidos no RNA-seq. Para tal fim, foi feita uma busca com objetivo de identificar os genes homólogos aos genes alvos selecionados. Após, foi realizada uma nova análise de predição de alvos para os microRNAs selecionados utilizando esses genes homólogos. Todos os genes preditos como alvos que estivessem também diferencialmente expressos foram escolhidos para os ensaios de RT-qPCR. Na tabela 8 é possível visualizar todos os genes escolhidos.

A figura 6 relaciona os dados de expressão gênica dos genes alvos do microRNA172k. Observam-se que todos os genes são responsivos em 1h de estresse, apesar da expressão continuar aumentando em 4h e 24h. Isto indica que a planta induz rapidamente o aumento da enzima trealose-6-fosfatossintase a fim de produzir maior quantidade do dissacarídeo trealose, que age como osmoprotetor e auxilia na tolerância ao estresse salino (DUQUE; ALMEIDA; SILVA, 2013). O gene Glyma.08G288600 aumenta expressivamente a expressão, chegando a cerca de 24 vezes após 24 horas de estresse salino.

Apesar de a expressão gênica por RT-qPCR estar condizente com os dados obtidos por RNA-seq, os valores são maiores no mesmo tempo de tratamento. O gene Glyma.08G288600 apresentou um aumento de 2,04 vezes pelo RNA-seq,

Tabela 7: Dados dos genes alvos preditos selecionados para RT-qPCR

	Gene Alvo	Expressão (fold change)	Valor p	Anotação	Expectância	Tipo de inibição	Similaridade ao primeiro gene identificado	Posição de inibição no gene alvo
<i>miRNA 172k</i>	Glyma.08G288600	2,04	0,00064	Trealose-6- fosfato sintase	2,5	Clivagem	-	2342 - 2362
	Glyma.01G031900	1,73	0,00417	Trealose-6- fosfato sintase	4,5	Clivagem	91,6%	3001 - 3021
	Glyma.06G184200	3,90	2,71e-12	Trealose-6- fosfato sintase	4,0	Clivagem	82,9%	3448 - 3468
	Glyma.04G180900	3,65	7,08e-10	Trealose-6- fosfato sintase	4,0	Clivagem	81,6%	3276 - 3296
	Glyma.18G136200	1,55	0,0578	Trealose-6- fosfato sintase	2,5	Clivagem	98,8%	2377 - 2397
	Glyma.02G234300	2,07	0,00105	U-box E3 ligase	2,0	Clivagem	-	1822 - 1841
<i>miRNA1512 (a,b,c)</i>	Glyma.02G291100	-1,63	0,02686	Endoribonuclease L-PSP	3,0	Clivagem	-	467 - 487
	Glyma.14G023600	-1,58	0,04357	Endoribonuclease L-PSP	3,0	Clivagem	84%	463 - 483

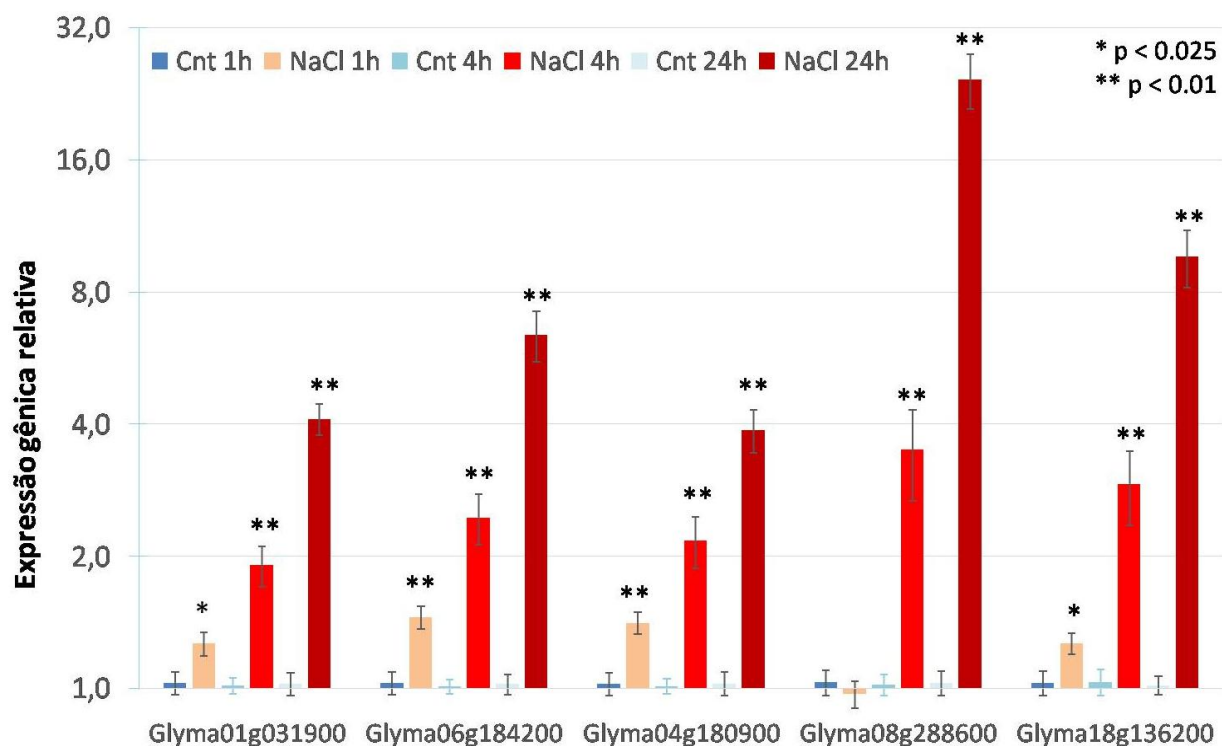


Figura 6: Dados de expressão gênica dos alvos preditos do microRNA 172k obtidos por RT-qPCR. Cnt: amostras controle; NaCl: amostras tratadas com excesso de sal. O cálculo foi feito pelo método matemático $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ponto a ponto, seguido de ANOVA e Teste de Tuckey.

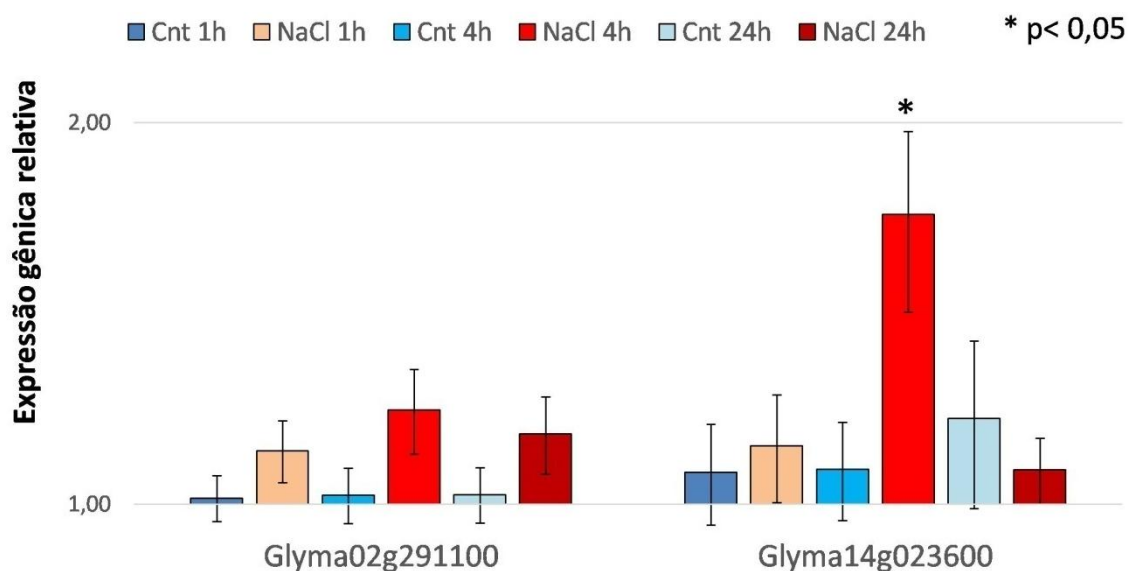


Figura 7: Dados de expressão gênica dos alvos preditos (endoribonucleases L-PSP) do microRNA 1512 (a,b,c) obtidos por RT-qPCR. Cnt: amostras controle; NaCl: amostras tratadas com excesso de sal. O cálculo foi feito pelo método matemático $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ponto a ponto, seguido de ANOVA e Teste de Tuckey.

enquanto no RT-qPCR a variação foi de 3,49. O gene Glyma.18g136200, por sua vez, apresentou valores de 1,55 e 2,91 de variação por RNA-seq e RT-qPCR, respectivamente. É possível que esta variação ocorra pois o ensaio de PCR em tempo real é mais sensível que o RNA-seq.

A figura 7 mostra os dados de expressão obtidos por RT-qPCR de duas endoribonucleases L-PSP, que são alvos preditos do microRNA 1512 (a,b,c). O gene Glyma.02g291100 não apresentou variação significativa em relação aos seus controles. Já o gene Glyma.14g023600 apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) em 4h de estresse salino, o que não condiz com os dados obtidos no RNA-seq, pois ambos genes deveriam diminuir sua expressão com aplicação do estresse. Provavelmente estes genes são regulados por outros mecanismos e não por microRNAs.

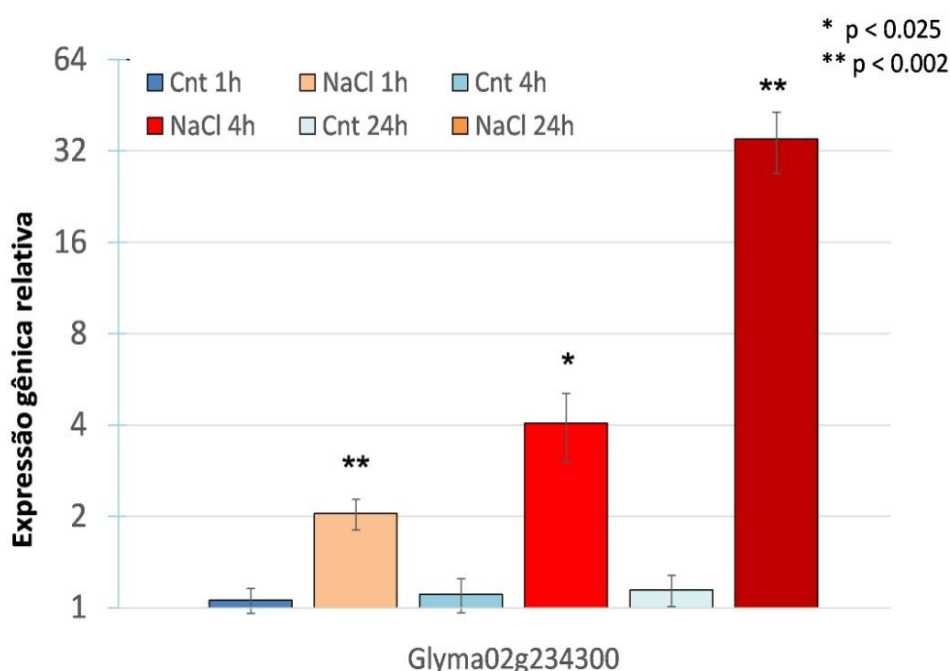


Figura 8: Dados de expressão gênica do alvo predito (U-box E3 ligase) do microRNA 5371 obtidos por RT-qPCR. Cnt: amostras controle; NaCl: amostras tratadas com excesso de sal. O cálculo foi feito pelo método matemático $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ponto a ponto, seguido de ANOVA e Teste de Tuckey.

A figura 8 apresenta os dados de expressão da U-box E3 ligase (Glyma.02g234300), que é uma enzima que seleciona e marca proteínas para ubiquitinação. O aumento da expressão gênica já é significativo com apenas 1h de

estresse salino e chega a aumentar aproximadamente 34 vezes após 24h. Este gene é altamente responsivo ao estresse e possivelmente possui papel fundamental na aclimação ao estresse. Conforme Mazzucotelli e colegas (2008), a degradação protéica mediada por ubiquitina/proteassomo possui papel fundamental na homeostase de Ácido Abscísico (ABA). Este fitohormônio possui papel majoritário na resposta a estresses, sendo produzido rapidamente após a percepção de desidratação (ZHANG et al., 2006).

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O estresse salino causa danos severos às plantas e diminui significativamente a produtividade, portanto é fundamental compreender os mecanismos e respostas a esta situação adversa. O presente trabalho identificou 3726 genes e 87 microRNAs responsivos ao estresse salino. Além disso, foram observados 16 microRNAs com padrão de expressão inverso em relação aos genes alvos preditos, o que indica que estes microRNAs podem ser reguladores dos genes indicados. Destes, 3 microRNAs e seus respectivos genes alvos foram selecionados para confirmação dos dados por PCR em tempo real. Somente os genes trealose-6-fosfato sintases e a U-box E3 ligase, apresentaram perfis de expressão gênica semelhantes ao obtido pelo RNA-seq. Além disso, todos estes 6 genes tiveram aumento de expressão significativo sob estresse curto (1h) e seguiram aumentando até 24h. Possivelmente, estes são importantes para tolerância ao excesso de sal.

Como perspectivas do trabalho, está a confirmação da expressão gênica dos microRNAs por RT-qPCR e a realização ensaios de superexpressão dos microRNAs *in vivo* e posterior quantificação da expressão gênica dos genes alvos por RT-qPCR.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERS, S.; PYL, P. T.; HUBER, W. Genome analysis HTSeq — a Python framework to work with high-throughput sequencing data. v. 31, n. 2, p. 166–169, 2015.

ARAVIND, L.; DIXIT, V. M.; KOONIN, E. V. The domains of death : evolution of the apoptosis machinery. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 0004, n. February, p. 47–53, 1999.

AZEVEDO, C. et al. The U-box protein family in plants. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 8, p. 354–358, 2001.

BASF. Limitadoras de Produtividade. **Caderno Técnico Cultivar Soja**, p. 12, 2013.

BELAMKAR, V. et al. Comprehensive characterization and RNA-Seq profiling of the HD-Zip transcription factor family in soybean (*Glycine max*) during dehydration and salt stress. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 950, 2014.

CÉLERES. **Informativo Biotecnologia: O segundo levantamento de adoção da biotecnologia no Brasil, safra 2013/14.** Disponível em: < <http://celeres.com.br/wordpress/wp-content/uploads/2013/12/IB13021.pdf> > Acesso em: abril, 2014.

CHÁVEZ, A.; BARRETO, E. **Área plantada com soja transgênica no Brasil após a legalidade safras 2003 / 2004 a 2012 / 2013** Congresso Internacional de Administração. **Anais...**Ponta Grossa: 2014

CHEN, X. et al. SQUAMOSA Protein-Binding Protein-Like Transcription Factors : Star Players for Plant Growth and Development. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 52, n. 11, p. 946–951, 2010.

CLEMENTE, T. E.; CAHOON, E. B. Soybean oil: genetic approaches for modification of functionality and total content. **Plant physiology**, v. 151, n. 3, p. 1030–1040, 2009.

COSTA, J.A. **Cultura da Soja**.Porto Alegre, Evangraf, p. 233, 1996.

CRAMER, G. R. et al. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. **BMC Plant Biology**, v. 11, n. 1, p. 163, 2011.

DAI, X.; ZHAO, P. X. psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. May, p. 155–159, 2011.

DEBAT, H. J.; DUCASSE, D. A. Plant microRNAs: Recent Advances and Future Challenges. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 32, p. 1257–1269, 2014.

DENG, H. L. B. Z. X.; WANG, X. Overexpression of the trehalose-6-phosphate synthase gene OsTPS1 enhances abiotic stress tolerance in rice. **Planta**, n. 234, p. 1007–1018, 2011.

DONG, Z. et al. Identification and dynamic regulation of microRNAs involved in salt stress responses in functional soybean nodules by high-throughput sequencing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 2, p. 2717–2738, 2013.

DUQUE, A.; ALMEIDA, A. DE; SILVA, A. DA. Abiotic Stress Responses in Plants: Unraveling the Complexity of Genes and Networks to Survive. In: **Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture**. [s.l: s.n.]. p. 49–101.

EMBRAPA SOJA. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1>> Acesso em: abril, 2015.

FAN, X. et al. Gene expression profiling of soybean leaves and roots under salt , saline – alkali and drought stress by high-throughput Illumina sequencing. **Gene**, v. 512, n. 2, p. 392–402, 2013.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> > Acesso em: abril, 2015.

GARG, A. K. et al. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. **PNAS**, n. 13, p. 15898–15903, 2002.

GODA, H. et al. The AtGenExpress hormone and chemical treatment data set: experimental design , data evaluation , model data analysis and data access. p. 526–542, 2008.

GÖPFERT, H.; ROSSETTI, L.A.; SOUZA, J. Eventos generalizados e segurança agrícola. Brasília: IPEA, Ministério do Planejamento, p. 78, 1993.

GUTIÉRREZ, R. A.; MACINTOSH, G. C.; GREEN, P. J. Current perspectives on

mRNA stability in plants : multiple levels and mechanisms of control. **Trends in Plant Science**, v. 4, n. 11, p. 429–438, 1999.

HU, R. et al. Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR. **BMC Molecular Biology**, v. 12, p. 1–12, 2009.

JOAZEIRO, C. A. P.; WEISSMAN, A. M. RING Finger Proteins: Mediators of Ubiquitin Ligase Activity. **Cell**, v. 102, p. 549–552, 2000.

JONES-RHOADES, M. W.; BARTEL, D. P.; BARTEL, B. MicroRNAs and Their Regulatory Roles in Plants. **Annual Review of Plant Molecular Biology**, 2006.

KIM, Y. J. et al. The role of Mediator in small and long noncoding RNA production in *Arabidopsis thaliana*. **The EMBO Journal**, v. 30, n. 5, p. 814–822, 2011.

KULCHESKI, F. R. et al. Identification of novel soybean microRNAs involved in abiotic and biotic stresses. **BMC genomics**, v. 12, n. 1, p. 307, 2011.

LAI, J. O. W. E. C. Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. **Biochimie**, v. 93, n. 11, p. 1897–1904, 2012.

LE, B. H. et al. Using genomics to study legume seed development. **Plant physiology**, v. 144, n. 2, p. 562–574, 2007.

LE, D. T. et al. Differential Gene Expression in Soybean Leaf Tissues at Late Developmental Stages under Drought Stress Revealed by Genome-Wide Transcriptome Analysis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 2012.

LEE, Y. et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **The EMBO Journal**, v. 23, n. 20, p. 4051–4060, 2004.

LIU, J. et al. Argonaute2 Is the Catalytic Engine of Mammalian RNAi. **Science**, v. 305, n. September, p. 1437–1442, 2004.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method. **Methods**, v. 408, n. 25, p. 402–408, 2001.

LONGSTRETH, D.J.; NOBEL, P.S. Salinity Effects on Leaf Anatomy: Consequences for Photosynthesis. **Plant Physiology**, v. 63, n. 4, p.700-703, 1979.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v. 15, n. 550, p. 1–21, 2014.

MARGIS, R. et al. The evolution and diversification of Dicers in plants. **FEBS Letters**, v. 580, p. 2442–2450, 2006.

MAZZUCOTELLI, E. et al. Abiotic stress response in plants: When post-transcriptional and post-translational regulations control transcription. **Plant Science**, v. 174, p. 420–431, 2008.

MENG, Y.; SHAO, C. Large-Scale Identification of Mirtrons in Arabidopsis and Rice. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. 1–6, 2012.

METZGER, M. B. et al. RING-type E3 ligases : Master manipulators of E2 ubiquitin-conjugating enzymes and ubiquitination. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1843, n. 1, p. 47–60, 2014.

METZKER, M. L. Sequencing technologies — the next generation. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 1, p. 31–46, 2009.

MIRBASE. Disponível em: < <http://www.mirbase.org/> > Acesso em: fevereiro de 2015.

MORIN, R. D. et al. Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. **Genome Research**, p. 610–621, 2008.

MUERS, M. Technology: Getting Moore from DNA sequencing. **Nature Publishing Group**, v. 12, n. SEPTEMBER, p. 3059, 2011.

NI, Z. et al. Overexpression of gma-MIR394a confers tolerance to drought in transgenic Arabidopsis thaliana. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 427, n. 2, p. 330–335, 2012.

PMTED. Disponível em: <<http://pmted.agrinome.org/>> Acesso em: fevereiro de 2015.

ROGERS, K.; CHEN, X. Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. **The Plant cell**, v. 25, n. 7, p. 2383–99, 2013.

SCHNEPF, R. D.; DOHLMAN, E. N.; BOLLING, H. C. **Agriculture in Brazil and**

Argentina: Developments and prospects for major field crops. Washington, DC: US Department of Agriculture, 2001.

SCHWACH, F. et al. miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. v. 447, n. June, p. 1126–1130, 2007.

SILVA, J. F. V. Tecnologias de Produção de Soja na Região Central do Brasil. **Sistemas e Produção**, p. 239, 2005.

STIRNIMANN, C. U. et al. WD40 proteins propel cellular networks. **Cell**, v. 35, p. 565–574, 2010.

SUN, X. L. et al. A Glycine soja ABA-responsive receptor-like cytoplasmic kinase, GsRLCK, positively controls plant tolerance to salt and drought stresses. **Planta**, v. 237, n. 6, p. 1527–1545, 2013.

SUNKAR, R.; LI, Y. F.; JAGADEESWARAN, G. Functions of microRNAs in plant stress responses. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 4, p. 196–203, 2012.

SZARZYNSKA, B. et al. Gene structures and processing of *Arabidopsis thaliana* HYL1-dependent pri-miRNAs. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 9, p. 3083–3093, 2009.

TAYLOR, R. S. et al. Evolutionary history of plant microRNAs. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 3, p. 175–182, 2014.

TRAPNELL, C. et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. **Nature protocols**, v. 7, n. 3, p. 562–78, 2012.

VALTER DE OLIVEIRA, L. F.; CHRISTOFF, A. P.; MARGIS, R. Sequence analysis isomiRID : a framework to identify microRNA isoforms. **Bioinformatics**, v. 29, n. 20, p. 2521–2523, 2013.

XIE, F. et al. High-throughput deep sequencing shows that microRNAs play important roles in switchgrass responses to drought and salinity stress. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, n. 3, p. 354–366, 2014.

XIE, Z. et al. Expression of *Arabidopsis* MIRNA Genes. **Plant physiology**, v. 138, n. August, p. 2145–2154, 2005.

ZHANG, J. et al. Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. v. 97, p. 111–119, 2006.

ZHANG, Q. et al. Genome-wide identification of *Thellungiella salsuginea* microRNAs with putative roles in the salt stress response. **BMC plant biology**, v. 13, n. 1, p. 180, 2013.

ZHAO, J. et al. Cloning and characterization of a novel CBL-interacting protein kinase from maize. **Plant Molecular Biology**, p. 661–674, 2009.

ZHOU, J. et al. Global genome expression analysis of rice in response to drought and high-salinity stresses in shoot , flag leaf , and panicle. **Plant Molecular Biology**, p. 591–608, 2007.

ZHOU, M.; LUO, H. MicroRNA-mediated gene regulation: Potential applications for plant genetic engineering. **Plant Molecular Biology**, v. 83, n. 1-2, p. 59–75, 2013.